



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/00, C07K 14/705, G01N 33/50</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 99/45108</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 10 septembre 1999 (10.09.99)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/00404 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 février 1999 (23.02.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/02725 5 mars 1998 (05.03.98) <b>FR</b> <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> HONORE, Eric [FR/FR]; 43, boulevard Bijou Plage, Villa "Le Nid", F-06160 Juan les Pins (FR). FINK, Michel [FR/FR]; Résidence "Le Capricorne", 74, boulevard Pasteur, F-94260 Fresne (FR). LAZDUNSKI, Michel [FR/FR]; 21, avenue Colombo, F-06000 Nice (FR). LESAGE, Florian [FR/FR]; Palais Flora, 12, avenue Auber, F-06000 Nice (FR). DUPRAT, Fabrice [FR/FR]; 1, les Tamaris, F-06220 Vallauris (FR). <b>(74) Mandataire:</b> BREESE, Pierre; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> NOVEL MECHANICALLY SENSITIVE MAMMAL POTASSIUM CHANNEL FAMILY ACTIVATED BY POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND THEIR USE PARTICULARLY FOR SCREENING MEDICINES <b>(54) Titre:</b> NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE MAMMIFERES MECANOSENSIBLES ET ACTIVES PAR LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET LEUR UTILISATION NOTAMMENT POUR LE CRIBLAGE DE DROGUES <b>(57) Abstract</b> The invention concerns a novel mechanically sensitive potassium channel family activated by polyunsaturated fatty acids in particular by arachidonic acid and by riluzole. The invention also concerns a method for screening a substance capable of modulating the ionic currents of said channels. <b>(57) Abrégé</b> La présente invention concerne une nouvelle famille de canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole. L'invention se rapporte aussi au procédé de criblage de substance susceptible de moduler les courants ioniques desdits canaux.		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldave	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE  
MAMMIFERES MECANOSENSIBLES ET ACTIVES PAR LES ACIDES  
GRAS POLYINSATURES ET LEUR UTILISATION NOTAMMENT POUR LE  
CRIBLAGE DE DROGUES.

5

La présente invention concerne une nouvelle  
classe de canaux potassium mécanosensibles activés par  
les acides gras polyinsaturés. L'invention est basée sur  
la découverte d'un nouveau canal potassium, dénommé  
10 TRAAK pour TWICK-Related AA-Activated K<sup>+</sup>channel,  
mécanosensibles activés par les acides gras  
polyinsaturés et également par le riluzole qui est un  
agent neuroprotecteur. Les propriétés des canaux de la  
famille TRAAK ainsi que leur distribution tissulaire  
15 confère à ces canaux un rôle primordial dans le  
transport de potassium chez un grand nombre de types  
cellulaires.

Les canaux potassium sont des protéines  
20 ubiquitaires et leur exceptionnelle diversité  
fonctionnelle en font des candidats idéaux pour un grand  
nombre de processus biologiques. Ils interviennent  
notamment dans la régulation de l'excitabilité neuronale  
et musculaire, sur le rythme cardiaque et sur la  
25 sécrétion d'hormone. Trois types structuraux de canaux  
potassium ont été décrits chez les mammifères. Le  
premier est le type "Shaker" qui est composé de sous-  
unités ayant 6 segments transmembranaires et un domaine  
P qui est impliqué dans la formation du pore ionique. Le  
30 second est le type IRK à deux segments transmembranaires  
et un domaine P. Le troisième a été décrit plus  
récemment et correspond au type TWIK qui a quatre  
segments transmembranaires et deux domaines P. Trois  
canaux de ce type ont été identifiés : TWIK-1 (Fink, M.  
35 et al. EMBO J. 15, 6854-6862 (1996), Lesage, F. et al.

EMBO J. 15, 1004-1011 (1996) TREK-1 et TASK (Duprat, F. et al. EMBO J. 16, 5464-5471 (1997). En dépit d'une structure générale conservée, ils ont des séquences primaires peu similaires, puisqu'ils présentent entre 20 à 25 % d'identité en acide aminé.

La présente invention est fondée sur la découverte et le clonage d'un nouveau canal désigné TRAAK, membre de la famille des canaux TWIK. Le gène codant ce canal est plus particulièrement homologue au niveau de sa séquence d'acides aminés au canal TREK-1 avec lequel il présente 38% d'identité en acide aminé. Le présente invention est également fondée sur les propriétés électrophysiologiques uniques de ces deux canaux TREK-1 et TRAAK. En effet, ces canaux produisent tous les deux des courants sélectifs au potassium qui sont activés par une tension appliquée à la membrane cellulaire, canaux dits mécanosensibles, ou par l'application d'acides gras polyinsaturés, notamment l'acide arachidonique qui est un messenger essentiel de la communication inter et intra-cellulaire et un important modulateur de l'excitabilité neuronale (Ordway, R. W., Singer, J.J. et Walsh, J. V. 14, 96-100 (1991), Bliss, T. V. P. et Collingridge, G. L. Nature 31-39 (1993), Piomelli, D. Curr. Opin. Cell. Biol. 5, 274-280 (1993), Meves, H. Prog. Neurobiol. 43, 175-186 (1994), Piomelli, D. Crit. Rev. Neurobiol. 8, 65-83 (1994). Ces canaux sont également ouverts par le riluzole qui est un agent neuroprotecteur (Malgouris, C. et al. J. Neurosci. 9, 3720-3727 (1989), Pratt, J. et al. Neurosci. Lett. 140, 225-230 (1992) utilisé en clinique pour prolonger la survie de malades atteints de sclérose latérale amyotrophique.

La mise en évidence de cette nouvelle classe de canaux potassium et l'expression hétérologue de ces

canaux permet notamment de disposer de nouveaux moyens pour rechercher par criblage des drogues capables de moduler l'activité de ces canaux potassium et donc de prévenir ou de traiter des maladies impliquant ces canaux, comme l'épilepsie, les pathologies cardiaques (arythmies) et vasculaires, les neurodégénérescences, particulièrement celles qui sont associées aux ischémies et aux anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies dans la sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires.

La présente invention a donc pour objet une protéine purifiée constituant un canal potassium mécanosensible activé par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole. Plus particulièrement, l'invention concerne la protéine constituant le canal TRAAK dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

De tels dérivés sont ceux dont la séquence comprend une modification et/ou une suppression et/ou une addition d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, dès lors que cette modification et/ou suppression et/ou addition ne modifie pas les propriétés du canal TRAAK. De tels dérivés peuvent être analysés par l'homme du métier selon les techniques décrites dans les exemples donnés ci-après qui ont permis de mettre en évidence les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal TRAAK. Un tel dérivé est plus particulièrement le canal TREK-1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2.

Des anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal

ionique de l'invention peuvent être préparés par les méthodes classiques décrites dans la littérature. Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence des canaux ioniques de l'invention dans différents tissus humains ou animaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, un canal TRAAK et/ou ses dérivés.

La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique purifiée comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal potassium mécanosensible activé par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal TRAAK dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine TRAAK est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement, une telle séquence d'acide nucléique comprend la séquence comprise entre les nucléotides 284 et 1477 de SEQ ID No:1 ou sa séquence complémentaire.

Une autre séquence d'acide nucléique selon l'invention comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal TREK-1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence

codant pour la protéine TREK-1 est représentée dans la  
liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2  
ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement,  
une telle séquence d'acide nucléique comprend la  
séquence comprise entre les nucléotides 484 et 1596 de  
SEQ ID No:2.

L'invention concerne également un vecteur  
comprenant au moins une molécule d'acide nucléique  
précédente, avantageusement associée à des séquences de  
contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou  
d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine  
constituant un canal ionique selon l'invention. La  
préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou  
l'expression dans un hôte des canaux de l'invention  
peuvent être réalisées par les techniques de biologie  
moléculaire et de génie génétique bien connues de  
l'homme du métier.

A titre d'exemple, un procédé de production  
d'une protéine constituant un canal cationique selon  
l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide  
nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite  
molécule dans un hôte cellulaire,
- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des  
conditions permettant la production de la protéine  
constituant le canal potassium,
- à isoler, par tous moyens appropriés les  
protéines constituant les canaux potassium de  
l'invention.

A titre d'exemple, un procédé d'expression  
d'un canal ionique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide  
nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite  
molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant l'expression des canaux potassium de l'invention.

5 L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

10 Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide.

15 L'invention concerne donc aussi les hôtes cellulaires et plus particulièrement les cellules transformés exprimant des canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TRAAK obtenues conformément aux procédés précédents. Ces cellules sont utiles pour le criblage de substances capables de moduler les courants des canaux TRAAK. Ce criblage est effectué en mettant en contact  
20 des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant les canaux de l'invention, puis en mesurant, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants potassium desdits canaux. Des techniques électrophysiologiques permettent également ces études et font aussi l'objet de  
25 la présente invention dès lors qu'elles mettent en oeuvre les canaux TRAAK ou leurs dérivés. Ce procédé de criblage permet d'identifier des drogues capables de moduler l'activité des canaux potassium de l'invention et donc susceptibles de prévenir ou de traiter des  
30 maladies impliquant ces canaux. Ces substances et leur utilisation comme médicament, isolés et détectés grâce aux procédés ci-dessus, font également partie de l'invention.



Plus particulièrement, l'invention concerne donc une substance chimique ou biologique capable de modifier les courants d'un canal potassium selon l'invention pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter des maladies du coeur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal, comme les pathologies cardiaques (arythmies) et vasculaires, les neurodégénérescences, particulièrement celles qui sont associées aux ischémies et aux anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies dans la sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires

Une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine constituant un canal TRAAK ou un dérivé de celui-ci, ou un vecteur comprenant cette molécule d'acide nucléique ou encore une cellule exprimant des canaux TRAAK, sont aussi utiles pour la préparation d'animaux transgéniques. Il peut s'agir d'animaux surexprimant lesdits canaux, mais surtout d'animaux dit "knock out", c'est à dire présentant une déficience en ces canaux; ces animaux transgéniques sont préparés par des méthodes connues de l'homme du métier, et permettent de disposer de modèles vivants pour l'étude de pathologies animales associées aux canaux TRAAK.

Ces animaux transgéniques de même que les hôtes cellulaires décrits précédemment sont utiles en tant que modèles pour l'étude de pathologies associées à ces canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés soient parce qu'ils surexpriment les canaux potassium du type canal TRAAK, soit parce qu'ils présentent une déficience en ces canaux potassium.

En outre, une protéine constituant un canal ionique neuronal TRAAK peut être aussi utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant ces canaux. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une de ces protéines éventuellement associée à un véhicule physiologiquement acceptable.

De même, les molécules d'acide nucléique de l'invention ou les cellules transformées par ladite molécule sont donc susceptibles d'être utilisées dans des stratégies de thérapie génique afin de compenser une déficience des canaux TRAAK au niveau de un ou plusieurs tissus d'un patient. L'invention concerne donc aussi un médicament comprenant des molécules d'acide nucléique de l'invention ou de cellules transformées par lesdites molécules pour le traitement de pathologie impliquant les canaux TRAAK et leurs dérivés.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent rapportant le travail de recherche ayant mené à l'identification et à la caractérisation de ces canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras et où il sera fait référence aux séquences et dessins en annexe dans lesquels :

- la figure 1 et SEQ ID NO:1 représentent la séquence nucléotidique de l'ADNc de TRAAK et la séquence en acide aminé de la séquence codante.

- la figure 2 représente l'alignement des séquences de TWIK-1, TREK-1, TASK et TRAAK qui sont les quatre canaux du type TWIK actuellement clonés chez les mammifères ainsi que le dendrogramme déduit de cet alignement. Les résidus identiques sont représentés sur fond noir et les résidus conservés sur fond gris.

- la figure 3 représente l'analyse par RT-PCR de la distribution de TREK-1 et TRAAK dans les tissus de la souris adulte. Des fragments des transcripts codant TREK-1 et TRAAK ont été amplifiés par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques, transférés sur membrane de nylon puis sondés avec des oligonucléotides internes marqués au phosphore 32.

- la figure 4 montre les propriétés électrophysiologiques des courants TRAAK enregistrés par la technique de voltage imposé sur des ovocytes de Xénope ayant reçu une injection d'ARNc de TRAAK (a, b, c) et sur des cellules COS transfectés avec un vecteur exprimant TRAAK (d, e, f). En (a) : les ovocytes ont été maintenus à un potentiel de -80 mV puis les courants ont été enregistrés à la suite de sauts de potentiel de -150 à +50 mV par incrément de 20 mV. Les enregistrements ont été réalisés dans un milieu externe contenant une concentration en  $K^+$  de 2 mM ou de 74 mM. En (b) : relation courant-potentiel selon la même expérience qu'en (a). En (c) : renversement de potentiel ( $E_{rev}$ ) des courants TRAAK en fonction de la concentration externe en  $K^+$ . En (d) : courants enregistrés sur des cellules COS transfectées par TRAAK suivant le même protocole qu'en (a). En (e) : relation courant-potentiel selon la même expérience qu'en (d).

- la figure 5 montre l'effet de l'osmolarité du milieu externe sur des ovocytes ayant reçu une injection d'ARNc TREK-1 ou TASK. En (A) : comparaison des effets de l'application d'une solution hypertonique (417 mOsm, par addition de mannitol) sur des ovocytes témoins (CD8) et sur des ovocytes exprimant TASK ou TREK-1. Les courants sont mesurés après un saut de potentiel de -80 à +80 mV. En inset est montré le courant TREK-1 avant et après (indiqué par une flèche) l'application de la solution hypertonique. En (B) :

effet réversible d'une solution hypertonique (434 mOsm, par addition de sucrose) sur les relations courant-potentiel déduites de rampes de potentiel qui durent 600 msec. En inset est montré la cinétique de l'effet produit par la solution hypertonique. Les courants sont mesurés à 80mV.

- la figure 6 montre que TREK-1 est un canal potassium mécanosensible dans les cellules COS transfectées. En (B) : activités canal ( $N \cdot P_o$ ) dans des "patches" de membrane maintenus à 0 mV et obtenus dans la configuration cellule attachée à partir de cellules témoins (CD8), ou de cellules transfectées par TREK-1 et TASK. En (C) l'étirement de la membrane n'a pas d'effet sur l'activité du canal TASK (configuration cellule attachée). Le "patch" est maintenu à 50mV. En (D) : les canaux TREK-1 sont silencieux au repos et ouvert lors d'une tension de la membrane. Le "patch" est maintenu à +50mV. En (E) histogramme donnant l'amplitude de l'activité canal engendrée par la tension de la membrane et illustrée en (G). En (F) : relation courant-potentiel en canal unique de TREK-1 ( $n=6$ ). La conductance de 81 pS a été calculée entre 0 et 80 mV. En (G) : activation de TREK-1 par étirement de la membrane (30 mm Hg) dans la configuration "inside-out". Le potentiel de maintien est 100 mV. En (H) : effet produits par des tensions de plus en plus importantes (5 sec de durée) sur la relation courant-potentiel d'un "patch" exprimant TREK-1. En (I) : courbe dose-effet de l'activation de TREK-1 par la tension ( $n=6$ ). La courbe est tracée en suivant les points expérimentaux suivant la relation de Boltzmann.

- la figure 7 montre l'activation de TRAAK par l'étirement de la membrane cellulaire dans les cellules COS transfectées. Le courant est enregistré à 0 mV dans la configuration "inside-out". Les dépressions

appliquées via la pipette d'enregistrement sont indiquées sur la droite des traces.

5 - la figure 8 montre l'activation de TREK-1 par l'acide arachidonique dans les cellules COS transfectées. En (A) : l'activité de TREK-1 est enregistrée dans la configuration cellule attachée. Le "patch" est stimulé par une rampe de potentiel durant 800 msec toutes les 5 sec. Les courants sont mesurés à 80 mV. Les applications d'acide arachidonique (AA, 10 $\mu$ M) 10 sont indiquées par les barres horizontales. Au cours de l'expérience, le "patch" a été stimulé par des tensions de 50 mm Hg (indiquées par des flèches). A 9 min, le "patch" a été excisé dans la configuration "inside-out". En (B) : relations courant-potentiel qui correspondent à 15 l'expérience illustrée en (A). En (C) : activité de TREK-1 dans la configuration cellule attachée avec 10  $\mu$ M AA dans la pipette. La rampe de potentiel dure 800 msec et les courants sont mesurés à 80mV. En (D) : relations courant-potentiel en canal unique au moment où la 20 pipette est posée sur la membrane ou après 20 min et 1 min après avoir excisé le "patch" dans la configuration "inside-out". En (E) effet de l'AA (10 $\mu$ M) sur le courant TREK-1 enregistré en cellule entière. Le courant est mesuré à 80mV. En (F) : l'AA est sans effet sur le 25 courant TREK-1 mesuré en cellule entière lorsqu'il est dans la pipette. Le courant est mesuré 30 min après avoir rompu le "patch" (trace contrôle) par une rampe de potentiel de 800 msec. Le courant est ensuite mesuré après une application d'AA de 1 min dans le milieu 30 externe (trace AA).

- la figure 9 montre l'effet de l'acide arachidonique et d'autres acides gras sur le canal TRAAK exprimé dans des cellules COS transfectées. En (a) : relations courant-potentiel obtenues à partir de rampes 35 de potentiel de 500 msec allant de -150 à +50 mV, après

application d'AA (10  $\mu$ M) et après lavage. En inset sont représentés les courants déclenchés par des sauts de potentiel de -130 à +50 mV par incrément de 20 mV. Le potentiel de maintien est -80mV. En (b) : relation dose-effet de l'activation de TRAAK par l'AA. En (c) : relations courant-potentiel obtenus comme en (a) dans la configuration "outside-out". En inset est montré l'effet de l'AA à 20 mV. En (e) : histogramme représentant le coefficient d'augmentation des courants obtenus après application de différents acides gras (10 $\mu$ M). En (f) : histogramme montrant la valeur des courants enregistrés dans la configuration de la cellule entière avant et après application d'AA sur des cellules transfectées transitoirement par TWIK-1, TASK, TREK-1 et TRAAK et sur des cellules transfectées de façon stable par TRAAK. Le coefficient d'augmentation est indiqué dans chaque cas.

- la figure 10 montre l'effet du riluzole sur les courants TREK-1 et TRAAK désigné TREK-2. Les relations courant-potentiel sont obtenus comme dans la figure 9a avant et après l'application de riluzole (100 $\mu$ M) sur des cellules COS transfectées. En inset sont montrés les effets du riluzole sur les courants enregistrés dans la configuration "outside-out".

#### I - Clonage, structure primaire et distribution tissulaire de TRAAK.

La séquence du canal TWIK-1 a été utilisée pour rechercher des séquences homologues dans les banques publiques de données d'ADN (Genbank et EMBL) en mettant en oeuvre le programme d'alignement BLAST. Il a ainsi été identifié une séquence exprimée TAG humaine qui a servi à cribler une banque d'ADNc de cerveau de souris. Plusieurs clones ont été isolés et caractérisés. Le plus long a été séquencé. Les caractéristiques suivantes ont été mises en évidence :

- les ADNc isolés contiennent une phase ouverte de lecture de 1197 nucléotides codant pour un polypeptide de 398 résidus. Les séquences nucléotidiques et protéiques sont montrées dans la figure 1.

5                   - cette protéine contient 4 segments transmembranaires potentiels et deux domaines P. Elle possède donc la même structure générale que les canaux TWIK-1, TREK-1 et TASK. De plus, elle présente des homologues de séquence avec ces canaux : environ 20-25%  
10 d'identité avec TWIK-1 et TASK et 38% avec TREK-1. En dehors des domaines P qui sont présents dans tous les canaux potassium clonés, elle n'a pas d'homologie de séquence significative avec les canaux de type Shaker et IRK. Elle appartient donc à la famille TWIK-1 et son  
15 homologue le plus proche est TREK-1. Ces relations apparaissent dans la figure 2 au niveau de l'alignement des séquences protéiques ainsi que dans le dendrogramme qui est déduit de cet alignement. TRAAK et TREK-1 forment donc une sous-classe structurale au sein de la  
20 famille TWIK-1.

                  - les séquences de différents oligonucléotides ont été déduits à partir de la séquence de TRAAK. Ces oligonucléotides ont permis par RT-PCR d'étudier la distribution du transcrit codant TRAAK dans  
25 les tissus de souris adulte. Comme le montre la figure 3, TRAAK est exclusivement exprimé dans des tissus neuronaux : cerveau, cervelet, moelle épinière et rétine. Cette distribution est très différente de celle de son plus proche homologue qui est le canal TREK-1.  
30 Celui a une distribution quasi ubiquitaire et est présent aussi bien dans les tissus excitables que dans les tissus non-excitables.

## II - Expression fonctionnelle de TRAAK.

Pour l'étude fonctionnelle, la séquence codante de TRAAK a été insérée dans le vecteur pEXO et un ARN complémentaire (ARNc) a été synthétisé à partir de cette construction et injecté dans des ovocytes de Xénope. Pour l'expression dans les cellules COS, la séquence de TRAAK a été sous-clonée dans un vecteur d'expression sous le contrôle d'un promoteur eucaryote et transfectée dans les cellules. Un courant non-inactivant absent des ovocytes et des cellules témoins a été mesuré par la technique de potentiel imposé comme représenté à la figure 4. L'activation est instantanée et ne peut être résolue car elle est masquée par la décharge capacitive du courant enregistré au début du saut de potentiel. La relation courant-potentiel rectifie dans le sens sortant lorsque la concentration externe en  $K^+$  est égale à 2 mM. Des courants entrants sont observés lorsque la concentration externe en  $K^+$  est augmentée. Quelque soit cette concentration, les courbes courant-potentiel suivent parfaitement la relation de Goldman-Hodgkin-Katz. Cela démontre que les courants TRAAK n'ont pas de rectification autre que celle qui est due aux concentrations dissymétriques de  $K^+$  de chaque côté de la membrane et que TRAAK est un canal qui n'est pas dépendant du potentiel. Le canal TRAAK est sélectif au potassium. Le renversement du potentiel des courants suit le potentiel d'équilibre du  $K^+$  et le changement par 10 de la concentration en  $K^+$  conduit à un changement de la valeur d'inversion du potentiel conforme à celle prédite par l'équation de Nernst ( $48.7 \pm 0.7$  mV par 10,  $n=4$ ).

Les propriétés de TRAAK, absence de cinétiques d'activation et d'inactivation aussi bien que son ouverture à tous les potentiels de membrane, sont



des caractéristiques des canaux potassium dits de fuite. Comme prévu pour des canaux de ce type, son expression dans les oocytes est associée à une forte polarisation. Le potentiel de repos de la membrane passe de  $-43 \pm 2,4$  mV, (n=7), dans les oocytes de contrôle à  $-88 \pm 1,4$  mV, (n=23) dans les oocytes transfectés, une valeur proche du potentiel d'équilibre du potassium. TRAACK a été aussi exprimé dans les cellules COS-M6 transfectées. Dans ce système aussi, les courants TRAACK sont instantanés et ne s'inactivent pas. L'enregistrement des "patch" en configuration "outside-out" indique une conductance unitaire de TRAACK égale à  $45,5 \pm 3,7$  pS (n = 10).

### III - TREK-1 et TRAACK sont des canaux mécanosensibles.

Il a été établi que la sous-classe structurale formée par les canaux  $K^+$  TREK-1 et TRAACK est associée à des propriétés électrophysiologiques uniques parmi les canaux  $K^+$  de type TWIK. Les canaux TREK-1 et TRAACK sont en effet activés par une tension appliquée à la membrane plasmique. Cette tension est obtenue soit indirectement en changeant l'osmolarité du milieu externe et donc le volume de la cellule soit plus directement en appliquant une dépression dans la pipette d'enregistrement. Les caractéristiques suivantes ont été mises en évidence :

- la figure 5 démontre que l'expression du canal TREK-1 dans des ovocytes de Xénope qui sont maintenus dans un milieu hypotonique induit des courants instantanés et non-inactivants. Quand l'osmolarité du milieu externe est augmentée en y ajoutant du mannitol, une importante diminution de l'amplitude du courant TREK-1 est observée ce qui démontre une sensibilité du canal au volume cellulaire. Le canal TASK lui n'est pas affecté par l'osmolarité du milieu externe.

- la figure 6 démontre que le canal TREK-1 est mécanosensible. Dans des cellules COS transfectées et sous des conditions de repos, l'activité de TREK-1 est indétectable dans la configuration cellule attachée alors que l'activité de TASK est facilement mesurable dans les mêmes conditions. Cependant, une dépression appliquée à la membrane par l'intermédiaire de la pipette d'enregistrement déclenche une ouverture du canal TREK-1. Un tel effet n'est pas vu avec TASK. L'activation de TREK-1 induit par la tension est également obtenu dans la configuration "inside-out" c'est à dire lorsque le "patch" est excisé et que la face interne de la membrane se retrouve en contact avec le milieu externe. Dans cette configuration, l'activité du canal est également absente ou très faible si on n'applique pas de tension à la membrane. L'effet de la tension est graduée et une activation qui est égale à la moitié de la valeur maximale est détectée pour une dépression équivalente à 23 mm de mercure. D'autre part, la figure 6h montre que l'activation induite par l'étirement est indépendante du potentiel de membrane.

- la figure 7 montre également que TRAAK est un canal activé par l'étirement. En absence de dépression ou pour de faibles valeurs, le canal TRAAK est inactif. Pour des valeurs plus élevées, le canal est activé et un courant est enregistré. Durant l'application de la dépression, une diminution de l'activité du canal est observable comme dans le cas de TREK-1.

IV - TREK-1 et TRAAK sont activés par l'acide arachidonique et d'autres acides gras polyinsaturés.

L'activation des canaux TREK-1 et TRAAK par étirement mécanique de la membrane est mimée par

l'application d'acide arachidonique et par l'application d'autres acides gras polyinsaturés, mais pas par l'application d'acides gras saturés. Les caractéristiques suivantes ont été mises en évidence :

5                   - la figure 8 démontre que TREK-1 est activé par l'acide arachidonique (AA). L'application d'AA sur des cellules témoins (CD8) n'a pas d'effet. Les activations obtenues par étirement de la membrane et par application d'AA sont similaires en amplitude mais ne  
10           sont pas additives. Les deux types d'activation sont réprimées dans la configuration cellule attachée. Quand la pipette d'enregistrement contient de l'AA, l'excision du "patch" dans la configuration "inside-out" induit de façon reproductible une augmentation importante de  
15           l'activité de TREK-1. De la même manière, l'amplitude de l'activation induite par une dépression appliquée dans la pipette d'enregistrement est plus importante lorsque le "patch" est excisé. Finalement, il a été observé qu'en cellule entière, l'AA interne n'active pas TREK-1.  
20           Quand la cellule est dialysée pour des périodes aussi longues que 30 minutes, aucune activation du canal par l'AA interne n'a lieu bien que l'activation soit observée quelques secondes après l'application d'AA dans le milieu externe. Ces résultats indiquent que l'AA  
25           active TREK-1 seulement lorsqu'il est appliqué sur la face externe de la membrane.

                  - la figure 9 démontre que le canal TRAAK est activé par l'AA de la même manière que TREK-1. L'activation est réversible et dépendante de la  
30           concentration appliquée. Cette activation est aussi observée dans la configuration "outside -out". L'activation de TRAAK par l'AA n'est pas prévenue quand la perfusion d'AA contient un mélange d'inhibiteurs du  
          métabolisme de l'AA (acide nordihydroguaiaretique pour  
35           la lipoxigénase, l'indométhacine pour la cyclooxygénase,

clotrimazole pour époxygénase et l'ETYA qui inhibe l'ensemble des voies de métabolisation de l'AA, tous à 10mM). Dans ces conditions, l'augmentation du courant induit par AA est de  $6.6 \pm 0.5$  fois ( $n=3$ ) (à +50mV). Une augmentation de  $1.7 \pm 0.4$  fois ( $n=3$ ) du courant de potassium de fond peut être observé après l'administration d'un cocktail d'inhibiteurs en l'absence d'AA. Ce résultat démontre que l'activation par l'AA ne requière pas la transformation de l'AA en eicosanoïdes.

- la figure 9 démontre également que des acides gras autres que l'AA activent le canal. Cette activation est spécifique des acides gras *cis* polyinsaturés et est observée avec les acides oléique (C18 $\Delta$ 9), linoléique (C18 $\Delta$ 9,12), linolénique (C18 $\Delta$ 9,12,15), eicosapentaénoïque (EPA, C20 $\Delta$ 5,8,11,14,17) et docosohexaénoïques (DOHA, C20 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19) à une concentration de 10 mM. Les acides saturés tels que les acides palmitique (C16), stéarique (C18) et arachidique (C20) sont quant à eux sans effet. Les dérivés de l'AA et de l'acide docosohexaénoïque où la fonction carboxylique est substituée par une fonction alcool (AA-OH) ou méthyl ester (AA-ME, DOHA-ME) sont également inactifs sur TRAAK. L'effet de l'AA sur TRAAK est observable aussi bien sur des cellules transfectées de façon transitoire que de façon stable (3 lignées de cellules stables indépendantes ont été testées).

- finalement, la figure 9 démontre que l'effet d'activation par l'AA est spécifique de TREK-1 et TRAAK. Aucun effet du même type n'est observé sur les canaux TWIK-1 et TASK.

Dans les oocytes, TRAAK est insensible aux agents bloquant des canaux potassium classiques tels que le tétraéthylammonium (TEA, 1mM), la 4-aminopyridine (4-

AP, 1mM) et la quinine (100 mM). Inversement,  $Ba^{2+}$  (1mM) bloque  $56,7 \pm 4,6 \%$ ,  $n=5$  du courant TRAAK à +40 mV.

5        V - Les canaux TREK-1 et TRAAK sont activés  
      par un agent neuroprotecteur : le riluzole.

10        Le riluzole est un agent neuroprotecteur qui est utilisé pour prolonger la survie des malades atteints de sclérose latérale amyotrophique. Le figure 10 démontre que cet agent pharmacologique est un ouvreur des canaux TREK-1 et TRAAK. TREK-1 et TRAAK sont les premiers canaux ioniques dont l'activité est stimulée par le riluzole.

## LISTE DE SÉQUENCES

## (1) INFORMATION GÉNÉRALES:

(iii) NOMBRE DE SÉQUENCES: 2

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:1 :

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1794 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRIN: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTÉRISTIQUES

(A) NOM/CLE: TRAACK

(B) EMBLACEMENT: de 284 à 1477

(xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCES: SEQ ID NO:1 :

CCACGCGTCC GCGGACGCGT GGGTCGCCCA CGCGTCCGGT GGCGGCTGTC CTGAGCCCCG	60
GGCCAGCTGA TGTCCAGGTT AGGGCAGCGT TGGGGCCCCA ATCCCAGCCT GGAAGGTTGG	120
ACTTCACGTC GACCCTTCTC TGAGTCTTCT GCCACTCACT GGCCTGGACA AGACAGCATT	180
GGGGAGCCCA GAGGCTGCAG GTGCAGTGAC CACTGCTCCC CAGGAGCTCC CTGCTCCTTC	240
TTCCAGGCA GGAAGTGGAG CTGGACCTGC CTCTGGAAGG ACC ATG CGC AGC ACC	295
Met Arg Ser Thr	
1	
ACA CTC CTG GCT CTG CTG GCA CTG GTG CTG CTT TAC TTG GTA TCT GGG	343
Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Leu Tyr Leu Val Ser Gly	
5 10 15 20	
GCT CTA GTG TTC CAG GCT CTG GAG CAG CCT CAC GAG CAG CAG GCT CAG	391
Ala Leu Val Phe Gln Ala Leu Glu Gln Pro His Glu Gln Gln Ala Gln	
25 30 35	
AAG AAA ATG GAT CAT GGC CGA GAC CAG TTT CTG AGG GAC CAT CCC TGT	439
Lys Lys Met Asp His Gly Arg Asp Gln Phe Leu Arg Asp His Pro Cys	
40 45 50	
GTG AGC CAG AAG AGC CTG GAG GAT TTC ATC AAG CTC CTG GTT GAA GCC	487
Val Ser Gln Lys Ser Leu Glu Asp Phe Ile Lys Leu Leu Val Glu Ala	
55 60 65	
CTG GGA GGG GGC GCA AAC CCA GAA ACC AGC TGG ACC AAT AGC AGC AAC	535
Leu Gly Gly Gly Ala Asn Pro Glu Thr Ser Trp Thr Asn Ser Ser Asn	
70 75 80	
CAC TCA TCA GCT TGG AAC CTG GGC AGC GCC TTC TTT TTC TCG GGG ACC	583
His Ser Ser Ala Trp Asn Leu Gly Ser Ala Phe Phe Phe Ser Gly Thr	
85 90 95 100	
ATC ATC ACT ACC ATC GGC TAT GGC AAT ATA GTC TTA CAC ACA GAT GCC	631
Ile Ile Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asn Ile Val Leu His Thr Asp Ala	
105 110 115	

GGG CGT CTC TTT TGT ATC TTC TAT GCA CTG GTG GGG ATC CCA CTG TTC	679
Gly Arg Leu Phe Cys Ile Phe Tyr Ala Leu Val Gly Ile Pro Leu Phe	
120 125 130	
GGG ATG CTG CTG GCG GGA GTC GGG GAC CGG CTG GGC TCC TCT CTG CGC	727
Gly Met Leu Leu Ala Gly Val Gly Asp Arg Leu Gly Ser Ser Leu Arg	
135 140 145	
CGG GGC ATC GGC CAC ATC GAA GCA ATC TTC TTG AAG TGG CAT GTG CCA	775
Arg Gly Ile Gly His Ile Glu Ala Ile Phe Leu Lys Trp His Val Pro	
150 155 160	
CCG GGG CTG GTG AGA AGT CTG TCC GCA GTG CTC TTC CTG CTG ATC GGC	823
Pro Gly Leu Val Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Phe Leu Leu Ile Gly	
165 170 175 180	
TGC CTG CTC TTT GTC CTC ACT CCT ACC TTC GTG TTC TCC TAC ATG GAG	871
Cys Leu Leu Phe Val Leu Thr Pro Thr Phe Val Phe Ser Tyr Met Glu	
185 190 195	
AGC TGG AGC AAG TTA GAA GCC ATC TAC TTT GTT ATA GTG ACT CTC ACC	919
Ser Trp Ser Lys Leu Glu Ala Ile Tyr Phe Val Ile Val Thr Leu Thr	
200 205 210	
ACT GTA GGC TTT GGC GAT TAT GTA CCC GGC GAT GGC ACC GGG CAG AAC	967
Thr Val Gly Phe Gly Asp Tyr Val Pro Gly Asp Gly Thr Gly Gln Asn	
215 220 225	
TCT CCA GCC TAC CAG CCG CTG GTG TGG TTC TGG ATC TTG TTT GGC CTA	1015
Ser Pro Ala Tyr Gln Pro Leu Val Trp Phe Trp Ile Leu Phe Gly Leu	
230 235 240	
GCC TAC TTC GCC TCA GTG CTC ACC ACC ATC GGC AAC TGG TTG CGA GCA	1063
Ala Tyr Phe Ala Ser Val Leu Thr Thr Ile Gly Asn Trp Leu Arg Ala	
245 250 255 260	
GTG TCC CGC CGA ACT CGG GCA GAG ATG GGT GGC CTA ACG GCA CAG GCT	1111
Val Ser Arg Arg Thr Arg Ala Glu Met Gly Gly Leu Thr Ala Gln Ala	
265 270 275	
GCT AGC TGG ACC GGC ACA GTG ACA GCG CGA GTG ACC CAG CGA ACT GGG	1159
Ala Ser Trp Thr Gly Thr Val Thr Ala Arg Val Thr Gln Arg Thr Gly	
280 285 290	
CCC AGC GCC CCG CCG CCA GAG AAG GAG CAA CCA CTC CTG CCC TCC TCT	1207
Pro Ser Ala Pro Pro Pro Glu Lys Glu Gln Pro Leu Leu Pro Ser Ser	
295 300 305	
TTG CCG GCA CCG CCT GCT GTT GTT GAG CCA GCC GGC AGG CCC GGC TCC	1255
Leu Pro Ala Pro Pro Ala Val Val Glu Pro Ala Gly Arg Pro Gly Ser	
310 315 320	
CCT GCA CCC GCA GAG AAG GTT GAG ACT CCG TCC CCG CCC ACG GCC TCA	1303
Pro Ala Pro Ala Glu Lys Val Glu Thr Pro Ser Pro Pro Thr Ala Ser	
325 330 335 340	
GCT CTG GAT TAC CCC AGT GAG AAT CTG GCC TTC ATC GAC GAG TCC TCA	1351
Ala Leu Asp Tyr Pro Ser Glu Asn Leu Ala Phe Ile Asp Glu Ser Ser	
345 350 355	

GAC ACG CAG AGT GAG CGT GGC TGT GCC CTG CCT CGG GCT CCT CGG GGT 1399  
Asp Thr Gln Ser Glu Arg Gly Cys Ala Leu Pro Arg Ala Pro Arg Gly  
360 365 370

CGC CGC CGA CCC AAC CCA TCC AAA AAG CCT TCC AGA CCC CGG GGT CCT 1447  
Arg Arg Arg Pro Asn Pro Ser Lys Lys Pro Ser Arg Pro Arg Gly Pro  
375 380 385

GGG CGA CTC CGA GAC AAG GCC GTG CCG GTG TAG GGGCAGGATC 1490  
Gly Arg Leu Arg Asp Lys Ala Val Pro Val \*  
390 395 398

TCTGGACCCG GATCCCACGC CAGGGCTTTC GCTCTTGCTG ATGCTCAGGC ATGCTTGGCT 1550

TATTTGACCA AAGAGCCGTC CCTCTTTTGT TCCACGTGGT TGCAACCCTG ACAGGAGTCC 1610

AGTGGTTGCC AAATGCCACC GCTCTTCCCT GGCTGGTTCT TCACATCCAA TCATTTCCAA 1670

AGCCCACCAT CCAAGGCTTT CTGCCTCGCT CCCCTGCCGG TTTTGACCCT CACACCTCAC 1730

AACTGTGCCT CAAAACCTGC ACCAATAAAA CAAAACCTCT GAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1790

AAAA 1794



## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:2 :

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: ... paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRIN: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUES

(A) NOM/CLE: TREK-1

(B) EMPLACEMENT: de 484 à 1596

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCES: SEQ ID NO:2 :

AGAGCGGCGA GGCGAGGGGA GAGTGGTGCT ACGGGCCAGG CGGGCCACCC CGGGCCACAC	60
CCCCACCTTG CGGGCGCCCG GCGGGGCTCG AGCCAGGCGG GGCGCCTCAC AAAGACATGC	120
GAAGAGGGGC TGCAGTGATC ACCCCCTCGC TGAGCCCCGG GGCAGAGCCC AGCCGCCCGG	180
CGAGCGCACG GAGCCACGGG CCGAGCGCAC CCAGGGCCCG CGCGGGACCC CAGGCGGCCA	240
CGCAATCGGG GTGACCCATC GCGCGCGGGG GCGTCGTCGT CCGATCCCAA CTTGGCCTCG	300
GCCTCGCCCT CTGCCCAGCC TGCCACCGCT GGTGTCCTCT CTTCCGGCG ATTTCTGTTT	360
TTCTCACGCT CCCCCCTCTA TACCCCTCCC GCCTCCAGCC CCGCTCTCCC CACCTTGTA	420
AACAAAGCCG GGGAAAATGC CTACCCGTGC AGCTCGGAGC GCGCAGCCCG TCTTGAATA	480
AGG ATG GCG GCC CCT GAC TTG CTG GAT CCC AAG TCT GCT GCT CAG AAC	528
Met Ala Ala Pro Asp Leu Leu Asp Pro Lys Ser Ala Ala Gln Asn	
1 5 10 15	
TCC AAA CCG AGG CTC TCA TTC TCT TCA AAA CCC ACC GTG CTT GCT TCC	576
Ser Lys Pro Arg Leu Ser Phe Ser Ser Lys Pro Thr Val Leu Ala Ser	
20 25 30	
CGG GTG GAG AGT GAC TCG GCC ATT AAT GTT ATG AAA TGG AAG ACA GTC	624
Arg Val Glu Ser Asp Ser Ala Ile Asn Val Met Lys Trp Lys Thr Val	
35 40 45	
TCC ACG ATT TTC CTG GTG GTC GTC CTC TAC CTG ATC ATC GGA GCC GCG	672
Ser Thr Ile Phe Leu Val Val Val Leu Tyr Leu Ile Ile Gly Ala Ala	
50 55 60	
GTG TTC AAG GCA TTG GAG CAG CCT CAG GAG ATT TCC CAG AGG ACC ACC	720
Val Phe Lys Ala Leu Glu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Gln Arg Thr Thr	
65 70 75	
ATT GTG ATC CAG AAG CAG ACC TTC ATA GCC CAG CAT GCC TGC GTC AAC	768
Ile Val Ile Gln Lys Gln Thr Phe Ile Ala Gln His Ala Cys Val Asn	
80 85 90 95	
TCC ACC GAG CTG GAC GAA CTC ATC CAG CAA ATA GTG GCA GCA ATA AAC	816
Ser Thr Glu Leu Asp Glu Leu Ile Gln Gln Ile Val Ala Ala Ile Asn	
100 105 110	
GCA GGG ATT ATC CCC TTA GGA AAC AGC TCC AAT CAA GTT AGT CAC TGG	864
Ala Gly Ile Ile Pro Leu Gly Asn Ser Ser Asn Gln Val Ser His Trp	
115 120 125	

GAC	CTC	GGA	AGC	TCT	TTC	TTC	TTT	GCT	GGT	ACT	GTT	ATC	ACA	ACC	ATA	912
Asp	Leu	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Phe	Ala	Gly	Thr	Val	Ile	Thr	Thr	Ile	
		130					135					140				
GGA	TTT	GGA	AAC	ATC	TCC	CCA	CGA	ACT	GAA	GGT	GGA	AAA	ATA	TTC	TGC	960
Gly	Phe	Gly	Asn	Ile	Ser	Pro	Arg	Thr	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Phe	Cys	
	145					150					155					
ATC	ATC	TAT	GCC	TTG	CTG	GGA	ATT	CCC	CTC	TTT	GGC	TTT	CTA	CTG	GCT	1008
Ile	Ile	Tyr	Ala	Leu	Leu	Gly	Ile	Pro	Leu	Phe	Gly	Phe	Leu	Leu	Ala	
160				165					170						175	
GGG	GTT	GGT	GAT	CAG	CTA	GGA	ACT	ATA	TTT	GGA	AAA	GGA	ATT	GCC	AAA	1056
Gly	Val	Gly	Asp	Gln	Leu	Gly	Thr	Ile	Phe	Gly	Lys	Gly	Ile	Ala	Lys	
			180						185					190		
GTG	GAA	GAC	ACA	TTT	ATT	AAG	TGG	AAT	GTT	AGT	CAG	ACG	AAG	ATT	CGT	1104
Val	Glu	Asp	Thr	Phe	Ile	Lys	Trp	Asn	Val	Ser	Gln	Thr	Lys	Ile	Arg	
			195					200					205			
ATC	ATC	TCC	ACC	ATC	ATC	TTC	ATC	CTG	TTT	GGC	TGT	GTC	CTC	TTT	GTG	1152
Ile	Ile	Ser	Thr	Ile	Ile	Phe	Ile	Leu	Phe	Gly	Cys	Val	Leu	Phe	Val	
		210					215					220				
GCT	CTC	CCT	GCG	GTC	ATA	TTC	AAG	CAC	ATA	GAA	GGC	TGG	AGC	GCC	CTG	1200
Ala	Leu	Pro	Ala	Val	Ile	Phe	Lys	His	Ile	Glu	Gly	Trp	Ser	Ala	Leu	
	225					230					235					
GAC	GCT	ATC	TAT	TTT	GTG	GTT	ATC	ACT	CTG	ACG	ACC	ATT	GGA	TTT	GGA	1248
Asp	Ala	Ile	Tyr	Phe	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Phe	Gly	
240				245					250						255	
GAC	TAC	GTG	GCA	GGT	GGA	TCA	GAC	ATT	GAA	TAT	CTG	GAC	TTC	TAC	AAG	1296
Asp	Tyr	Val	Ala	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Tyr	Leu	Asp	Phe	Tyr	Lys	
			260					265						270		
CCT	GTG	GTG	TGG	TTC	TGG	ATC	CTC	GTT	GGG	CTG	GCC	TAC	TTT	GCA	GCT	1344
Pro	Val	Val	Trp	Phe	Trp	Ile	Leu	Val	Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe	Ala	Ala	
			275					280					285			
GTT	CTG	AGC	ATG	ATT	GGG	GAC	TGG	CTA	CGG	GTG	ATC	TCT	AAG	AAG	ACG	1392
Val	Leu	Ser	Met	Ile	Gly	Asp	Trp	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Lys	Lys	Thr	
	290					295						300				
AAG	GAA	GAG	GTG	GGA	GAG	TTC	AGA	GCG	CAT	GCC	GCT	GAG	TGG	ACA	GCC	1440
Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Glu	Phe	Arg	Ala	His	Ala	Ala	Glu	Trp	Thr	Ala	
	305					310					315					
AAT	GTC	ACG	GCC	GAG	TTC	AAG	GAA	ACG	AGG	AGG	CGG	CTG	AGC	GTG	GAG	1488
Asn	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Glu	Thr	Arg	Arg	Arg	Leu	Ser	Val	Glu	
320				325					330						335	
ATC	TAC	GAC	AAG	TTC	CAG	CGT	GCC	ACA	TCC	GTG	AAG	CGG	AAG	CTC	TCC	1536
Ile	Tyr	Asp	Lys	Phe	Gln	Arg	Ala	Thr	Ser	Val	Lys	Arg	Lys	Leu	Ser	
			340					345						350		
GCA	GAG	CTG	GCG	GGC	AAC	CAC	AAC	CAG	GAA	CTG	ACT	CCG	TGT	ATG	AGG	1584
Ala	Glu	Leu	Ala	Gly	Asn	His	Asn	Gln	Glu	Leu	Thr	Pro	Cys	Met	Arg	
			355					360					365			
ACC	TGT	CTG	TGA	ACCACCTGAC	CAGCGAGAGG	GAAGTCCTGC	CTCCCTTGCT									1636
Thr	Cys	Leu	*													
		370														

GAAGGCTGAG	AGCATCTATC	TGAACGGTCT	GACACCACAC	TGTGCTGGTG	AGGACATAGC	1696
TGTCATTGAG	AACATGAAGT	AGCCCTCTCT	TGGAAGAGTC	TGAGGTGGAG	CCATAGGGAA	1756
GGGCTTCTCT	AGGCTCTTTG	TGACTGTTGC	CGGTAGCATT	TAAACATTGT	GCATGGTGAC	1816
CTCAAAGGGA	AAGCAAATAG	AAAACACCCA	TCTGGTCACC	TTACATCCAG	GGAGGGTGTT	1876
GTCCCGAGGC	GGCACTCTGA	GGATGCCGTG	TGCTGTCCGC	TGAGTGCTGA	GTGATGGACA	1936
GGCAGTGTCT	GATGCCTTTT	GTGCCCAGAC	TGTTTCCCCT	CCCCCTCTCT	CCTAACG	1993

## REVENDEICATIONS

5 1) Protéine purifiée constituant un canal potassium mécanosensible activé par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole.

10 2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

15 3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2, dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2.

20 4) Anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

25 5) Molécule d'acide nucléique purifiée comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

30 6) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 5 comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 284 et 1477 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire.

35 7) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 5 comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 484 et 1596 de la séquence représentée

dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 ou sa séquence complémentaire.

5 8) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 avantageusement associé à des séquences de contrôle.

10 9) Procédé de production d'une protéine constituant un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste :

15 - à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7 ou un vecteur selon la revendication 8 dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant ledit canal potassium,

20 - à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant lesdits canaux.

25 10) Procédé d'expression d'un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7 ou un vecteur selon la revendication 8 dans un hôte cellulaire,

30 - à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production desdits canaux potassium.

35 11) Hôte cellulaire obtenu par un procédé selon la revendication 10.

12) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 11, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants desdits canaux.

13) Procédé selon la revendication 12 appliqué au criblage de substances capables de prévenir ou traiter des maladies du coeur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal.

14) Utilisation d'une substance chimique ou biologique capable de modifier les courants d'un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter des maladies du coeur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal.

15) Utilisation selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter les pathologies cardiaques et vasculaires, les neurodégénérescences, particulièrement celles qui sont associées aux ischémies et aux anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies dans la sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires

16) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou un anticorps selon la revendication 4, ou une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7 ou un vecteur selon la revendication 8, éventuellement associé à un véhicule physiologiquement acceptable.

Fig. 1

1/10

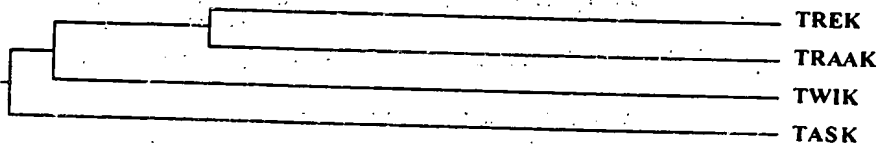
1 ccacgcgctccgcggacgcgctgggctgccccacgcgctccggctggcggctgctcc  
52 igagccccgggcccagctgagctccaggcttagggcagcgctggggccccaat  
103 cccagccctgggaaggctgggacttcacgctcgaccccttcctcagctctcctgccc  
154 actcactggcctggacaagacagcaltggggagccccagagctgcaggctgc  
205 agtgaccactgctccccaggagctccccctgctccttcctcccaaggcaggag  
256 tggagctggacctgacctcctgggaaggaccATGCCGACGACCACACTCCTGGC  
1 M R S T T L L A  
307 TCTGCTGGCACTGGTGGTGGTTTACTTGGTATCTGGGGCTCTAGTGTTCCA  
9 L L A L V L L Y L V S G A L V Q  
358 GGCTCTGGAGCAGCCTCACGAGCAGCAGGCTCAGAAGAAAATGGATCATGG  
26 A L E Q P H E Q Q A Q K K M D H G  
409 CCGAGACCAGTTTCTGAGGGACCATCCCTGTGTGAGCCAGAAGAGCCTGGA  
43 R D Q F L R D H P C V S Q K S L E  
460 GGATTTTCATCAAGCTCCTGGTTGAAGCCCTGGGAGGGGGCGAAACCCAGA  
60 D F I K L L V E A L G G G A N P E  
511 AACCAGCTGGACCAATAGCAGCAACCACTCATCAGCTTGAACCTGGGCAG  
77 T S W T N S S N H S S A W N L G S  
562 CGCCTTCTTTTCTCGGGGACCATCATCACTACCATCGGCTATGGCAATAT  
94 A F F F S G T I I T T I G Y G N I  
613 AGTCTTACACACAGATGCCGGCGCTCTCTTTTGTATCTTCTATGCACTGGT  
111 V L H T D A G R L F C I F Y A L V  
664 GGGGATCCCACTGTTCGGGATGCTGCTGCGGGGAGTCGGGGACCGGCTGGG  
128 G I P L F G M L L A G V G D R L G  
715 CTCCTCTCTCGCGCGGGCATCGGCCACATCGAAGCAATCTTCTTGAAGTG  
145 S S L R R G I G H I E A I F L K W  
766 GCATGIGCCACCGGGGCTGGTGAGAAAGTCTGTCCGCACTGCTCTTCTGCT  
162 H V P P G L V R S L S A V L F L L  
817 GATCGGCTGCCTGCTCTTGTCTCACTCCTACCTTCGTGTTCTCCTACAT  
179 I G C L L F V L T P T F V F S Y M  
868 GGAGAGCTGGAGCAAGTTAGAAGCCATCTACTTTGTTATAGTGACTCTCAC  
196 E S W S K L E A I Y F V I V T L T  
919 CACTGTAGGCTTTGGCGATTATGTACCCGGCGATGGCACCGGGCAGAACTC  
213 T V G F G D Y V P G D G T G Q N S  
970 TCCAGCCTACCAGCGGCTGGTGTGGTTCCTGGATCTTGTTCGGCTAGCCTA  
230 P A Y Q P L V W F W I L F G L A Y  
1021 CTTCCCTCAGTGCTCACCACCATCGGCAACTGGTTGCGAGCAGTGTCCTCG  
247 F A S V L T T I G N W L R A V S R  
1072 CCGAACTCGGGCAGAGATGGGTGGCCTAACGGCACAGGCTGCTAGCTGGAC  
264 R T R A E M G G L T A Q A A S W T  
1123 CGGCACAGTGACAGCGCGAGTGACCCAGCGAACTGGGCCCAGCGCCCCGCC  
281 G T V T A R V T Q R T G P S A P P  
1174 GCGAGAGAAGGAGCAACCACTCTGCCCTCCTCTTTGCCGGCACCGCCTGC  
298 P E K E Q P L L P S S L P A P P A  
1225 TGTTGTTGAGCCAGCCGGCAGGCCCGGCTCCCCTGCACCCGCAGAGAAGGT  
315 V V E P A G R P G S P A P A E K V  
1276 TGAGACTCCGTCCCCGCCACGGCCTCAGCTCTGGATTACCCCACTGAGAA  
332 E T P S P P T A S A L D Y P S E N  
1327 TCTGGCCTTCATCGACGAGTCTCAGACACGCAGAGTGAGCGTGGCTGTGC  
349 L A F I D E S S D T Q S E R G C A  
1378 CCTGCCTCGGGCTCCTCGGGGTGCGCCGCCGACCCAACCCATCCAAAAAGCC  
366 L P R A P R G R R R P N P S K K P  
1429 TTCCAGACCCCGGGTCTCGGGCACTCCGAGACAAGGCCGTGCCGGTGT  
383 S R P R G P G R L R D K A V P V \*  
1480 Ggggcaggatctctggaccggatccccagccagggttttcgctcttgcctg  
399  
1531 atgctcaggcaatgcttggcttatttgaccaaagagccgtccctcttcttgtt  
1582 ccacgtggcttgcaacccctgacaggagctccagtggttgccaaatgccaccgc  
1633 tcttccctggcttggcttcttcacatccaatcalttccaaaggccaccatcca  
1684 aggtcttctgcttgccttcccttgcgggttttgacctcacacctcacaacl  
1735 gggcttcaaaaccttgaccaata



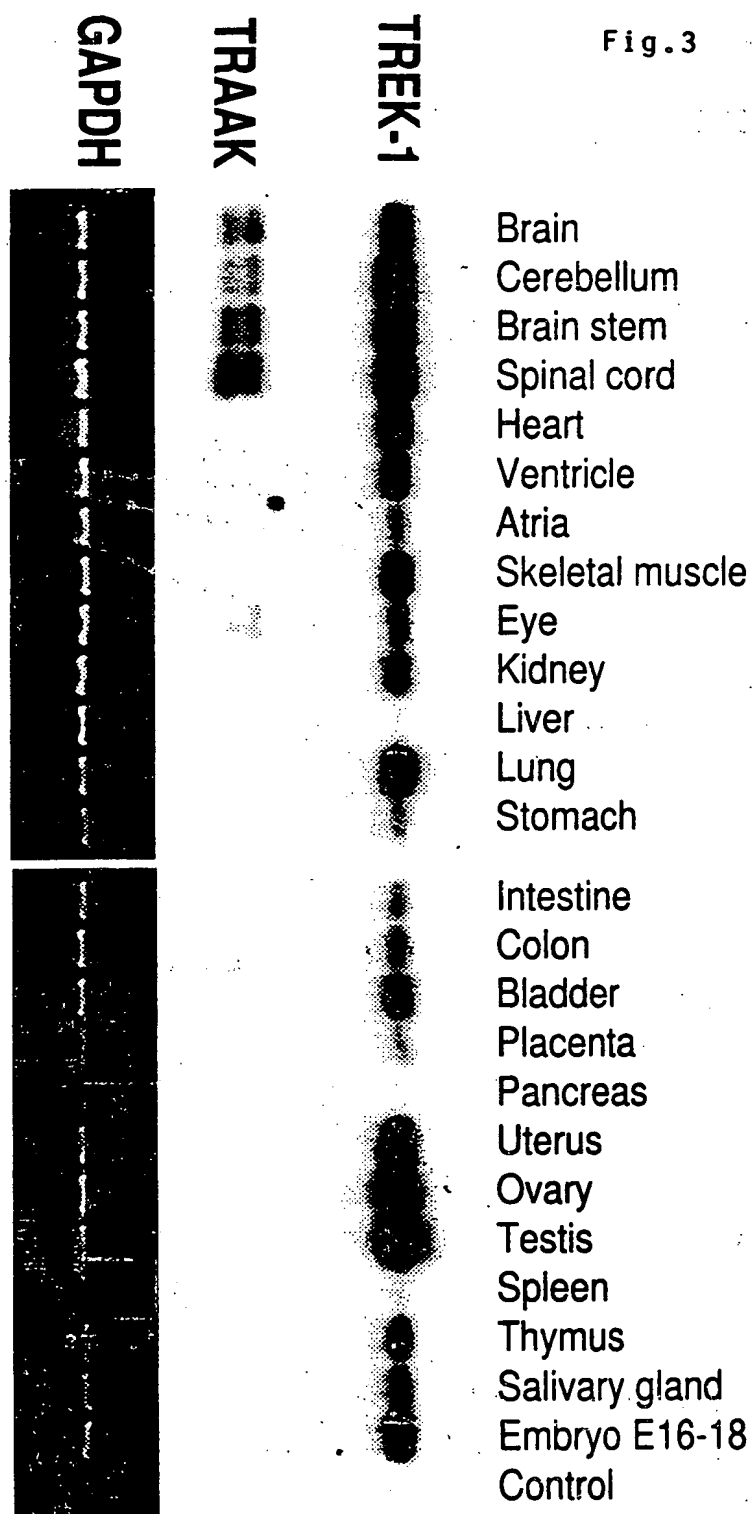
2/10

Fig.2

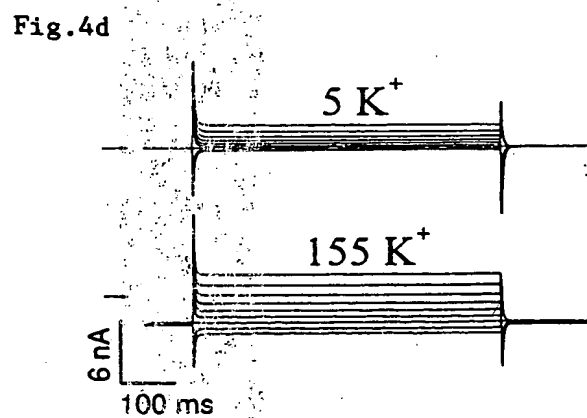
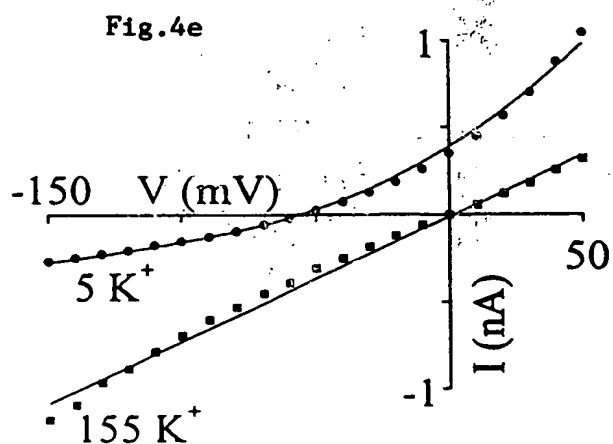
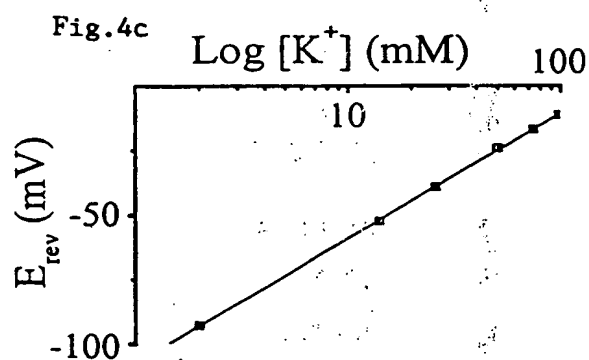
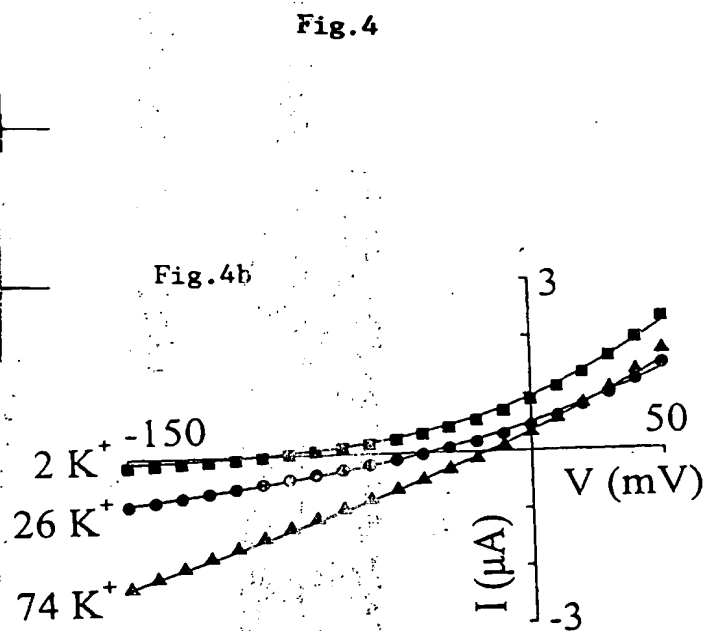
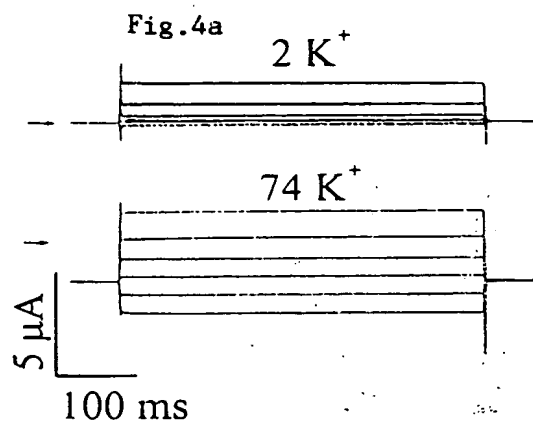
TWIK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTVLA	LAGSSCVRLV
TREK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTVLA	SRVESDSA
TASK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTVLA	SRVESDSA
TAAK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTVLA	SRVESDSA
M1			
TWIK	15	ERHRS	AWCFGLVGLYLLVLF
TREK	39	INVMKWKIVSTIFLVVLYLLI	GAAVFKALEOPOEISO
TASK	1	MKRONVRTLALIVCTFTYLLV	GAAVDALESEPELIE
TAAK	1	MRSTLLALLLVLLVLS	CAVFOALEOPHEQQA
M2			
TWIK	53	ROELRKLKRRELEEHECL	SEQL
TREK	77	RTTIVIOKOTFIAQHACVN	STEL
TASK	38	RORFELRQOELHARYNLS	OGGYEELERVLR
TAAK	36	QKKMDHGRDOFLRDHP	CVSOKSLEDFIKLLVEALGGGA
P1			
TWIK	91	SVLS	NASG-NWN
TREK	115	PLG	NSSNQVSHWDLGSSFF
TASK	72	HKAG	VQWR
TAAK	74	NPETSWT	NSSNHSSANLGS
M2			
TWIK	125	PLSDGGKA	FCIIYSVIGIPFILL
TREK	150	PRTEGGKI	FCIIYALLGIPFGF
TASK	101	PSIDGGKV	FCMEYALLGIPF
TAAK	112	LHTDAGR	FCIFYALVGIPFGML
M3			
TWIK	163	RPVLYFHIRWGFSKOV	VAIVHAVL
TREK	188	GIAKVEDT	FIKWNVSOTKIR
TASK	139	LLHRAKKGLGMRRADVS	MANMVL
TAAK	150	GIGHIEA	FLKWHVPPGLVRS
P2			
TWIK	199	PAAVFSVLEDD	WNELES
TREK	226	PAVIFKHIEG	WSALDA
TASK	174	GAAAFSHYEH	WTFEOAY
TAAK	188	PTFVESYMES	WSKLEA
M2			
TWIK	236	GYNOKFRELYKIGIT	CYELLGLIAMLV
TREK	262	SDIEYLDFYKPV	WFWLYGLAYFAAV
TASK	211	DOALOTQPOYVAF	SVVLTGLTV
TAAK	224	GTGONS	PAYOPLVWVLEGLAYFASV
M2			
TWIK	274	KKFRKMFYVKDKD	DEDO
TREK	299	SKKIKKEEVGE	FRHAAE
TASK	249	MNAEDEKRD	AEHRA
TAAK	261	VSRRTRAEMGGLT	AAAS
M2			
TWIK	298	STAAAGGGG	FRNVYAEVLH
TREK	330	PSAPPPE	KEOPLP
TASK	287	STAAAGGGG	FRNVYAEVLH
TAAK	293	PSAPPPE	KEOPLP
M2			
TWIK	301	FSSITDQAG	MK-E
TREK	333	SVETIDYKFOR	ATSVKRKLSAEL
TASK	325	IPMITIPDLS	ISDTCVEOSHSS
TAAK	324	SPAPAEKVET	PSPTTASALDYPSEN
M2			
TWIK	331	DGPANH	
TREK	367	RTCL	
TASK	359	RRCLCSGAP	SAISSVSTGLHS
TAAK	362	RGCALPRAPR	GRRGNPSKKPS



3/10



4/10



5/10

Fig.5

Fig.5a

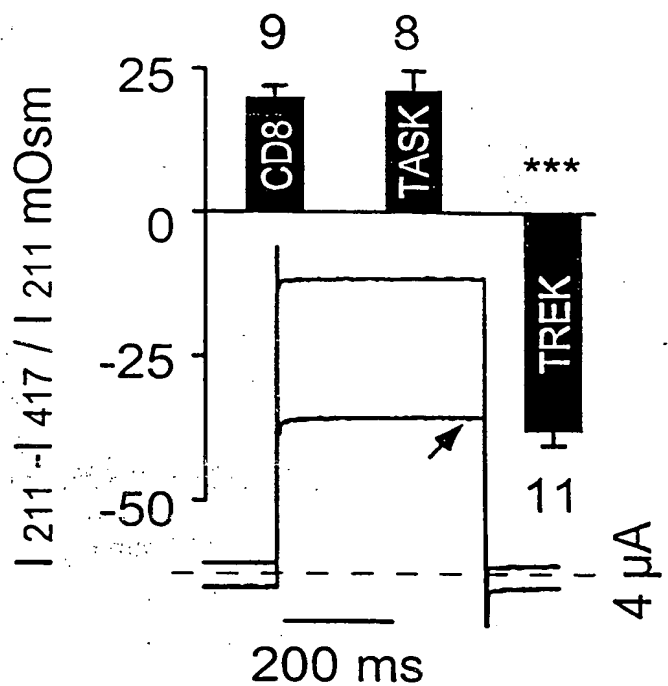
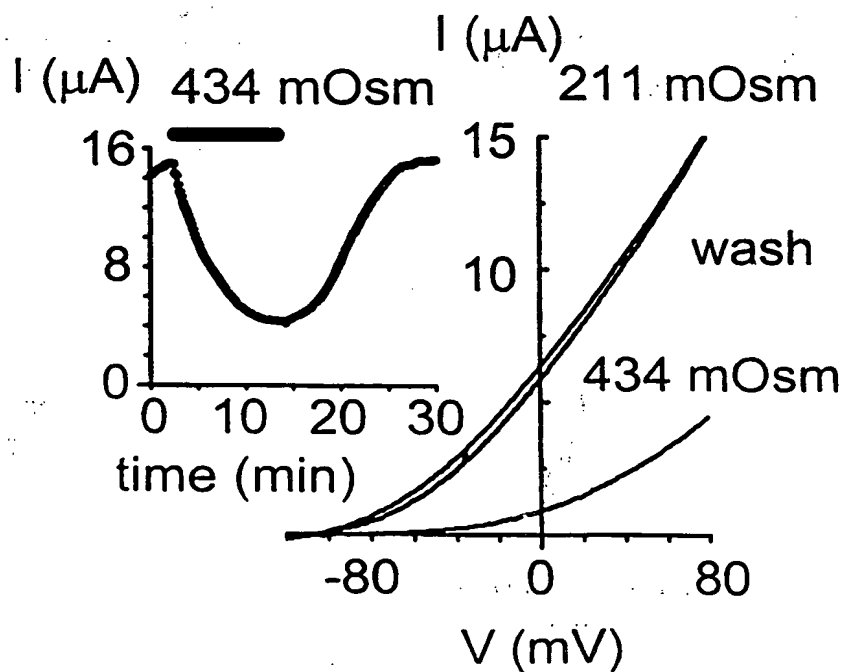


Fig.5b



6/10

Fig.6b

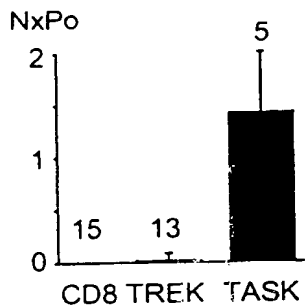


Fig.6

Fig.6e

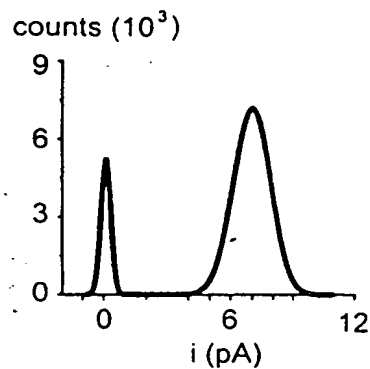


Fig.6c

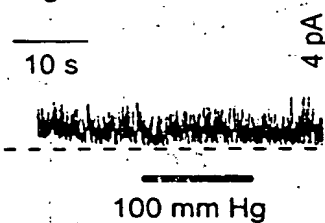


Fig.6d



Fig.6f

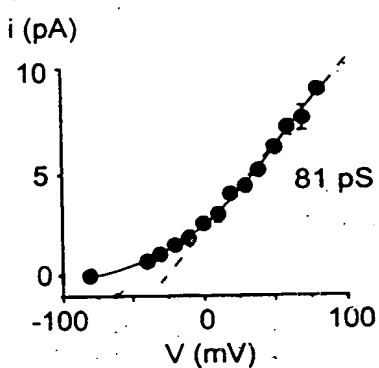


Fig.6i

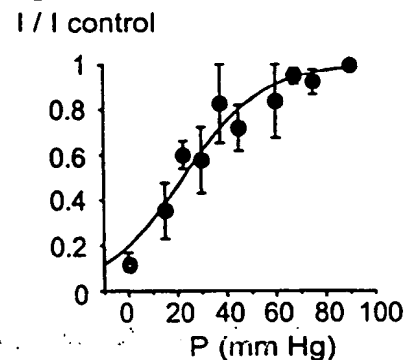


Fig.6g

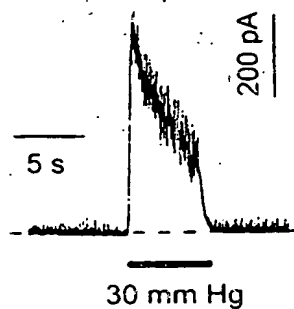
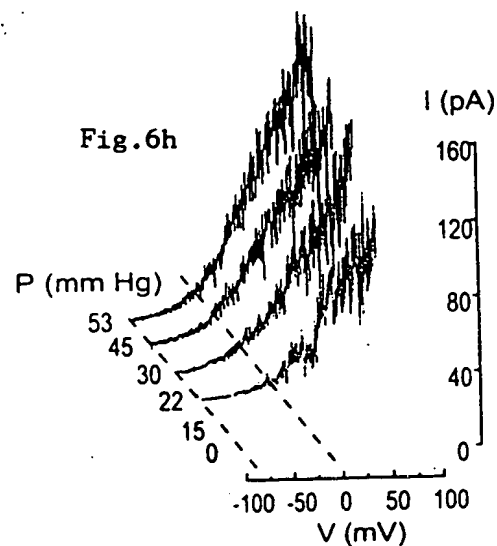


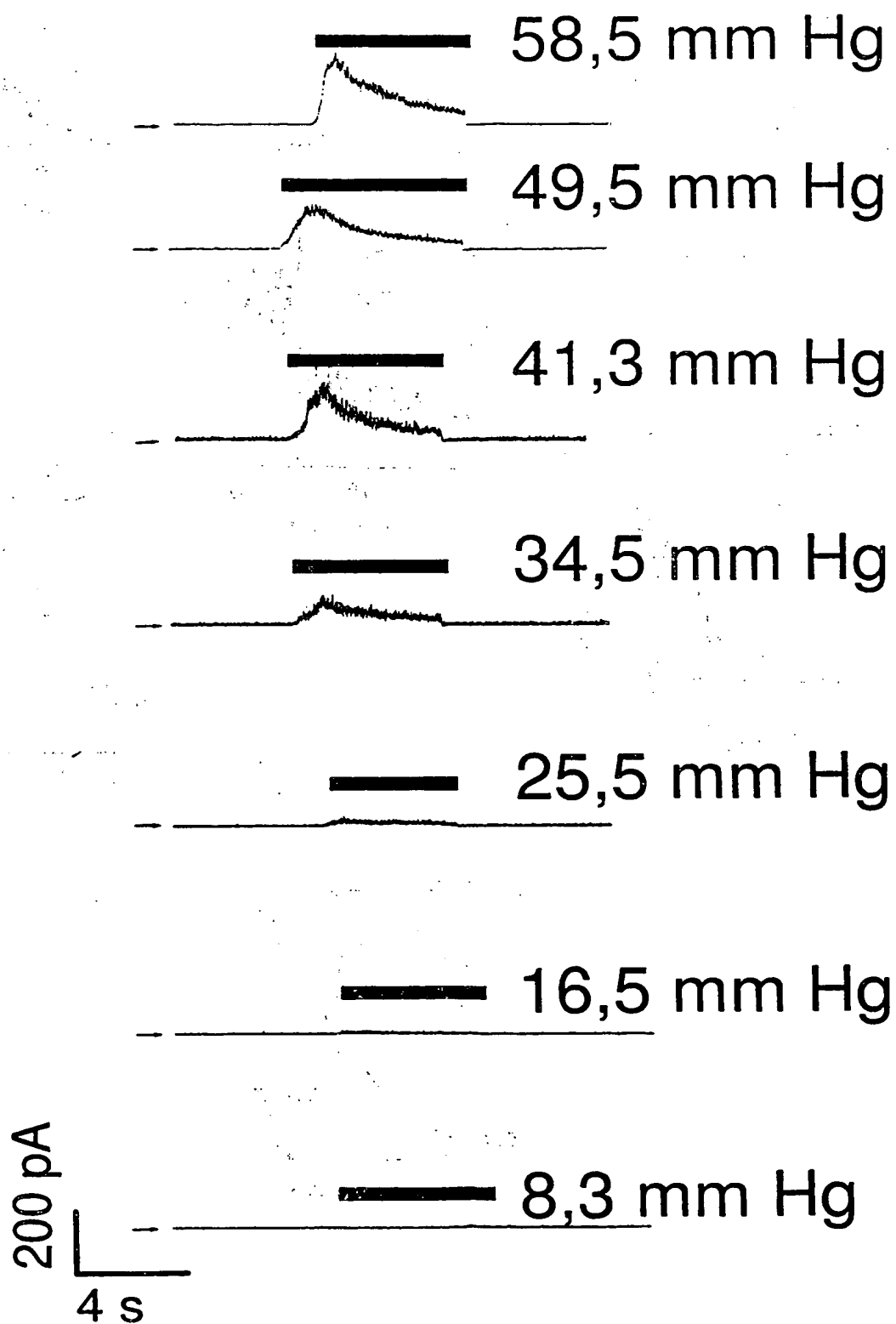
Fig.6h



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLÉ 26)

7/10

Fig. 7



8/10

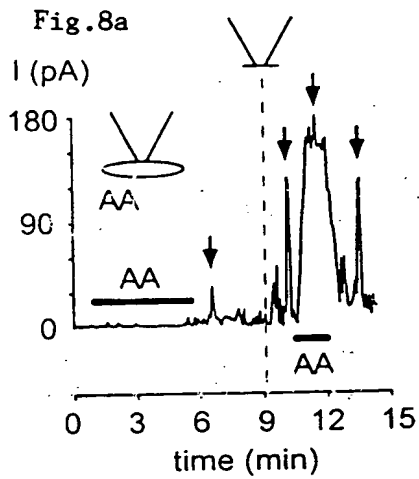
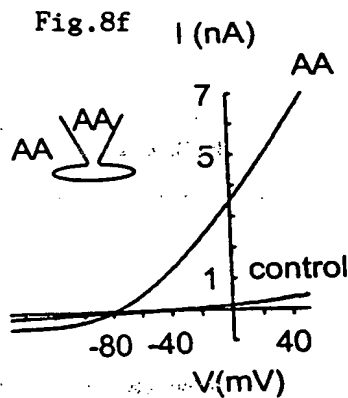
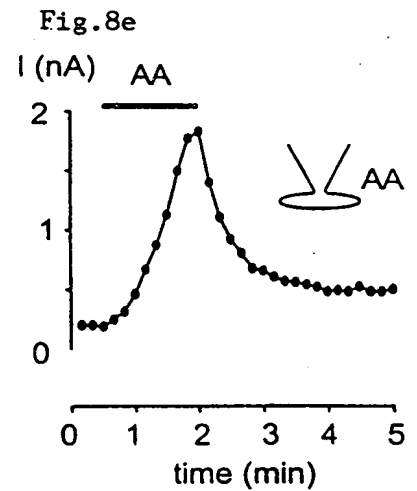
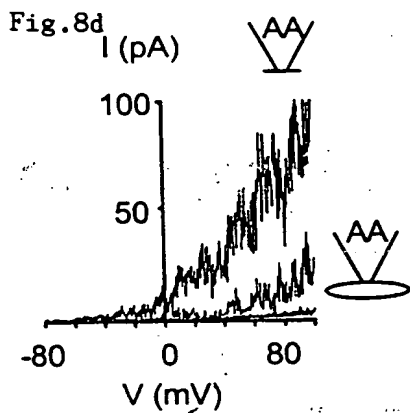
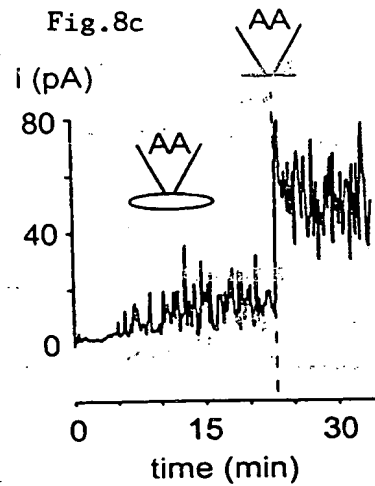
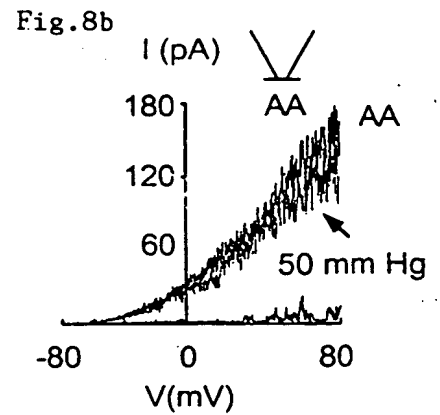


Fig.8



9/10

Fig. 9a

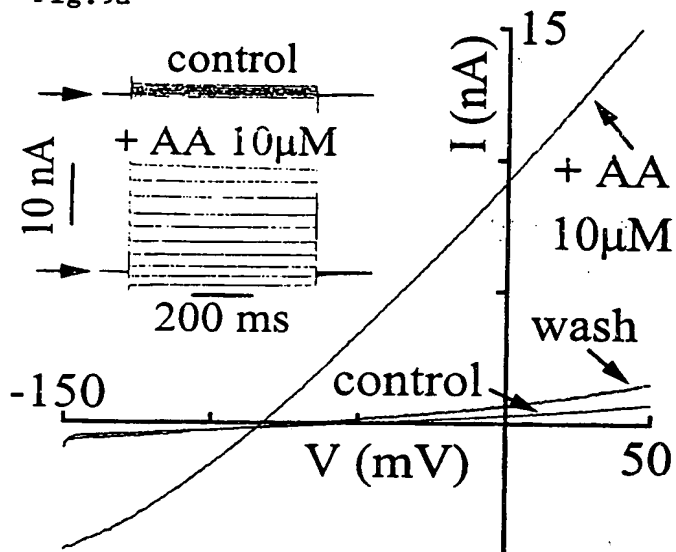


Fig. 9

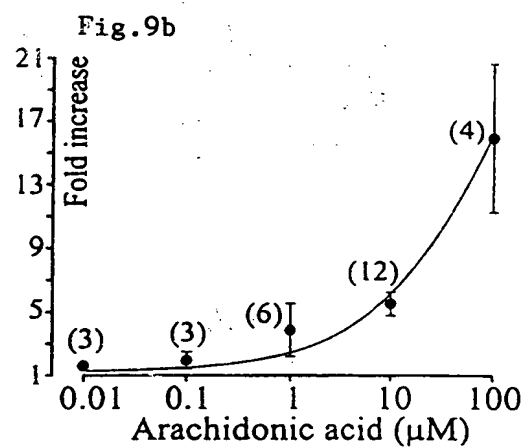


Fig. 9c

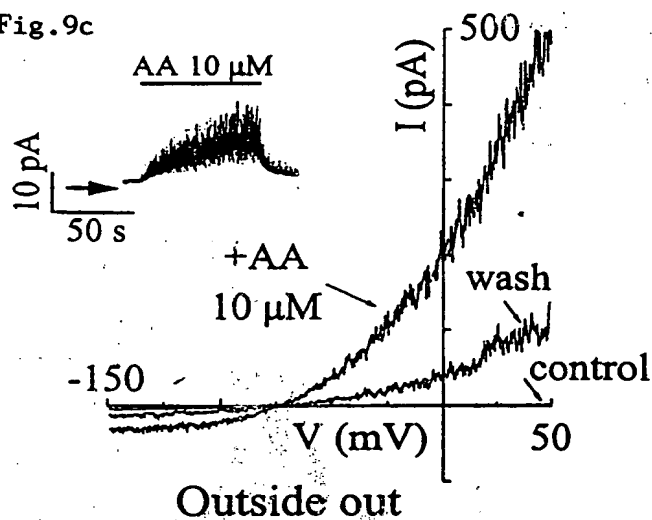


Fig. 9d

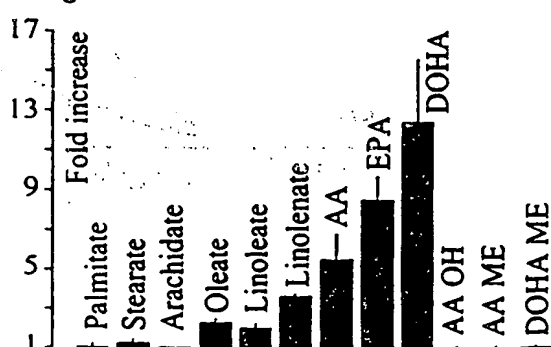
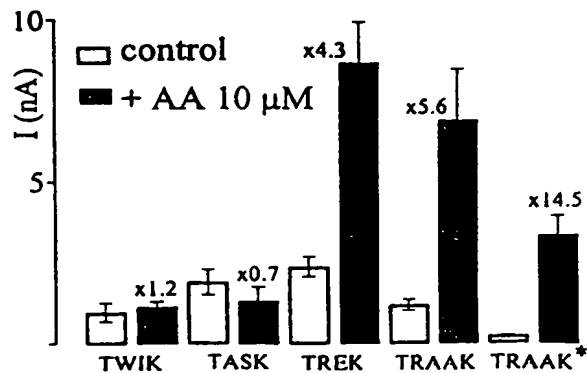


Fig. 9e





10/10

Fig. 10a

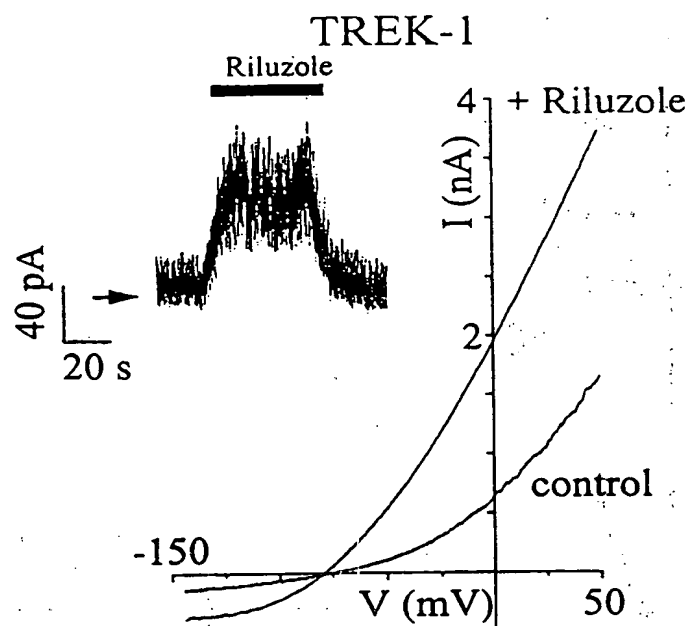
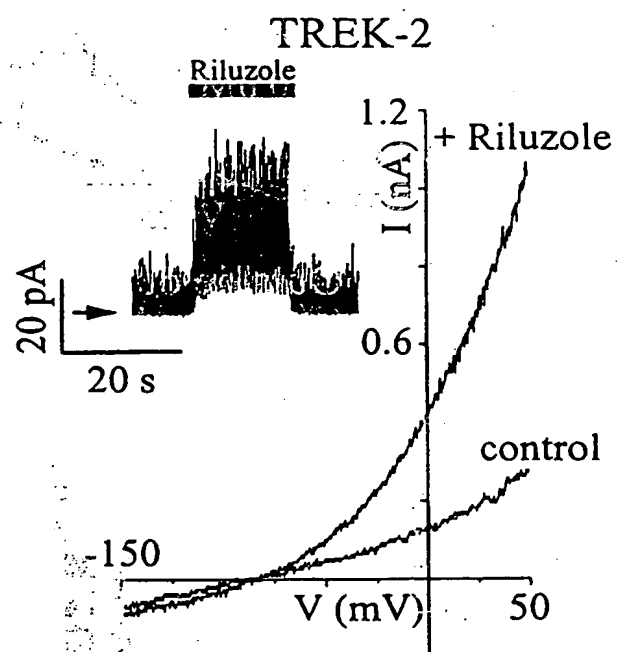


Fig. 10

Fig. 10b







## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/00, C07K 14/705, G01N 33/50</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 99/45108</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 10 septembre 1999 (10.09.99)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/00404 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 février 1999 (23.02.99)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/02725                      5 mars 1998 (05.03.98)                      FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> HONORE, Eric [FR/FR]; 43, boulevard Bijou Plage, Villa "Le Nid", F-06160 Juan les Pins (FR). FINK, Michel [FR/FR]; Résidence "Le Capricorne", 74, boulevard Pasteur, F-94260 Fresne (FR). LAZDUNSKI, Michel [FR/FR]; 21, avenue Colombo, F-06000 Nice (FR). LESAGE, Florian [FR/FR]; Palais Flora, 12, avenue Auber, F-06000 Nice (FR). DUPRAT, Fabrice [FR/FR]; 1, les Tamaris, F-06220 Vallauris (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> BREESE, Pierre; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>  <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 2 mars 2000 (02.03.00)
<b>(54) Title:</b> NOVEL MECHANICALLY SENSITIVE MAMMAL POTASSIUM CHANNEL FAMILY ACTIVATED BY POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND THEIR USE PARTICULARLY FOR SCREENING MEDICINES  <b>(54) Titre:</b> NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE MAMMIFERES MECANOSENSIBLES ET ACTIVES PAR LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET LEUR UTILISATION NOTAMMENT POUR LE CRIBLAGE DE DROGUES  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a novel mechanically sensitive potassium channel family activated by polyunsaturated fatty acids in particular by arachidonic acid and by riluzole. The invention also concerns a method for screening a substance capable of modulating the ionic currents of said channels.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne une nouvelle famille de canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole. L'invention se rapporte aussi au procédé de criblage de substance susceptible de moduler les courants ioniques desdits canaux.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LS	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00404

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/00 C07K14/705 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FINK M. ET AL.: "Cloning, functional expression an brain localization of a novel unconventional outward rectifier K+ channel" EMBO JOURNAL, vol. 15, 1996, pages 6854-6862, XP002085602 EYNHAM, OXFORD GB the whole document	1-11
Y	FR 2 744 730 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 14 August 1997 (1997-08-14) abstract	1,12-14



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January 2000

Date of mailing of the international search report

17/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/00404

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIM D.: "A mechanosensitive K <sup>+</sup> channel in heart cells" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 100, no. 6, 1992, pages 1021-1040, XP002085599 abstract	1, 12-14
T	----- FINK M. ET AL.: "A neuronal two P domain K <sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids" EMBO JOURNAL, vol. 17, no. 12, 15 June 1998 (1998-06-15), pages 3297-3308, XP002085600 EYNHAM, OXFORD GB the whole document	1-12
T	----- PATEL A.J. ET AL.: "A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K <sup>+</sup> channel" EMBO JOURNAL, vol. 17, no. 15, 3 August 1998 (1998-08-03), pages 4283-4290, XP002085601 EYNHAM, OXFORD GB abstract	1
A	----- WO 96 03415 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 8 February 1996 (1996-02-08) abstract -----	9-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00404

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2744730	A	14-08-1997	EP	0799889 A	08-10-1997
WO 9603415	A	08-02-1996	AU	7551494 A	22-02-1996
			EP	0783510 A	16-07-1997
			JP	10504714 T	12-05-1998

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demi Internationale No

PCT/FR 99/00404

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/00 C07K14/705 G01N33/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FINK M. ET AL.: "Cloning, functional expression an brain localization of a novel unconventional outward rectifier K <sup>+</sup> channel" EMBO JOURNAL, vol. 15, 1996, pages 6854-6862, XP002085602 EYNHAM, OXFORD GB le document en entier	1-11
Y	FR 2 744 730 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 14 août 1997 (1997-08-14) abrégé	1,12-14

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 janvier 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk

Fonctionnaire autorisé



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demo Internationale No

PCT/FR 99/00404

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	KIM D.: "A mechanosensitive K <sup>+</sup> channel in heart cells" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 100, no. 6, 1992, pages 1021-1040, XP002085599 abrégé	1,12-14
T	--- FINK M. ET AL.: "A neuronal two P domain K <sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids" EMBO JOURNAL, vol. 17, no. 12, 15 juin 1998 (1998-06-15), pages 3297-3308, XP002085600 EYNHAM, OXFORD GB le document en entier	1-12
T	--- PATEL A.J. ET AL.: "A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K <sup>+</sup> channel" EMBO JOURNAL, vol. 17, no. 15, 3 août 1998 (1998-08-03), pages 4283-4290, XP002085601 EYNHAM, OXFORD GB abrégé	1
A	--- WO 96 03415 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 8 février 1996 (1996-02-08) abrégé	9-15
	-----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 99/00404

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2744730 A	14-08-1997	EP 0799889 A	08-10-1997
WO 9603415 A	08-02-1996	AU 7551494 A	22-02-1996
		EP 0783510 A	16-07-1997
		JP 10504714 T	12-05-1998